



TITLE:

泌尿器科領域の組織培養, 特に癌をめぐる線溶系とその臨床的応用 (第30回泌尿器科中部連合地方会)

AUTHOR(S):

久住, 治男; 三崎, 俊光; 内藤, 克輔; 田谷, 正; 打林, 忠雄; 塚原, 健治; 小林, 徹治; ... 小泉, 久志; 西野, 昭夫; 越田, 潔

CITATION:

久住, 治男 ...[et al]. 泌尿器科領域の組織培養, 特に癌をめぐる線溶系とその臨床的応用 (第30回泌尿器科中部連合地方会). 泌尿器科紀要 1981, 27(7): 829-841

ISSUE DATE:

1981-07

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/122921>

RIGHT:

—第30回泌尿器科中部連合地方会—

特 別 講 演

泌尿器科領域の組織培養，特に癌をめぐる
線溶系とその臨床的応用

久 住 治 男

協同研究者：三崎 俊光・内藤 克輔・田谷 正

打林 忠雄・塚原 健治・小林 徹治

中嶋 和喜・加藤 正博・西東 康夫

小泉 久志・西野 昭夫・越田 潔

TISSUE CULTURE STUDIES IN THE UROLOGICAL FIELD,
PARTICULARLY IN A RELATION TO THE FIBRINOLYTIC
SYSTEM IN CANCER AND ITS CLINICAL IMPLICATIONS

Haruo HISAZUMI

Coworkers: MISAKI, T., NAITO, K., TAYA, T., UCHIBAYASHI, T., TSUKAHARA, K.,

KOBAYASHI, T., NAKAGIMA, K., KATO, M., SAITOH, Y., KOIZUMI, H.,

NISHINO, A. and KOSHIDA, K.

*From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University**(Director: Prof. K. Kuroda)*

In this special lecture presented were the results of tissue culture studies of urological cancers in our department. The tissue cultures have been introduced into our experimental investigations of the fibrinolytic system in neoplasms, particularly bladder cancer, and of an *in vitro* sensitivity test of anticancer drugs. In addition, the results of our clinically significant studies related to the fibrinolytic system in the diagnostic and therapeutic aspects of bladder cancer were reported.

Using a micro-single radial immunodiffusion method, serum protease inhibitors including α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin and CIs-inhibitor were increased, whereas plasminogen was decreased in bladder cancer patients. These changes were remarkable in patients with an advanced bladder cancer and the decrease of α_2 -macroglobulin, a distinct condition in DIC, was also found. The depressed fibrinolytic activity indicated by these results would be a predisposing cause of fibrin depositions in cancerous tissues or blood vessels, and explain that patients with an advanced tumor are prone to develop vascular thrombosis and tend to occur a peculiar form of intravascular coagulation.

During last 6 years, 75 out of 172 human urological malignant tumors subjected to tissue culture studies were succeeded in a primary culture, and 2 cell lines, KK-47 and KW-103, derived from transitional cell carcinomas of the bladder, and 2 cell lines, KN-41 and KH-39, from renal cell carcinomas, have been established and these cell lines utilized for the subsequent studies.

Three human bladder carcinoma cell lines, T24, RT4 and MANO, a human bladder non-malignant epithelial cell line, HCV-29, and a human lung fibroblast line, 460 HI, were investigated for their ability to induce fibrinolytic, urokinase and plasmin inhibitory activities in cell culture, using serum-free medium, for up to 36 hrs. Generally, the non-malignant cell line and the fibroblast line

had a greater ability to produce urokinase inhibitor than did the malignant cell lines. The low concentration of plasminogen activator, immunologically identical with urokinase, and its accumulation in culture supernatant were found with RT4 after 12-hr and 24-hr cultivations, whereas no plasminogen activator was detected in all other cell lines for periods up to 36 hrs. No plasmin, non-specific protease or plasmin inhibitory activities were detected in any of the supernatants from the cell lines. Moreover, ^{125}I -fibrin coated culture dishes were adopted for a meticulous detection of *in vitro* plasminogen activator production by cultured cells in Ham F12 medium supplemented with 20 per cent calf serum. In this assay system, KK-47, KW-103 and KN-41 cells resulted in an accumulation of plasminogen activator in the medium along with their logarithmic cell growth curves. However, in case of culture dishes not coated by fibrin, a temporary production of plasminogen activator occurred for the first 24 hrs of culture periods, and then a progressive lowering of the production was found in spite of their logarithmic cell proliferation. These *in vitro* results suggested that the activator production by cultured cells may be stimulated by the coexistence of fibrin and it may overcome the activity of fibrinolysis inhibitors. This suggestion would be able to explain a mechanism between the production and elimination of fibrin depositions in cancerous tissues and a rapid turnover of fibrinogen or fibrin in cancer patients. Clinically, the presence of this turnover would be manifested by an increased urinary FDP in bladder cancer patients, and urinary FDP would be considered as a biochemical marker in bladder cancer.

Enhanced cell killing effect by thio-TEPA and urokinase on KK-47 cells was investigated using methods of assessing cell growth and ^3H -thymidine uptake. A combined use of urokinase and thio-TEPA resulted in a significant increase of the thio-TEPA toxicity with a 2-hr and 24-hr exposure times. A peak in ^{32}P -thio-TEPA uptake in the cells was observed 2 hrs after administration of the agent, and about 2-time increase in the peak was obtained by adding urokinase. From the results, it was suggested that the increased cytotoxicity may be related with a gross change in cell permeability to thio-TEPA through plasminogen activation by urokinase. This conclusion was introduced into the topical prophylactic combination use of thio-TEPA, carboquone or cytosine arabinoside and urokinase in bladder cancer patients. The recurrence rates of the thio-TEPA and carboquone therapies for the postoperative 12 months were 10 and 14 per cent, and 22 and 33 per cent for the postoperative 24 months, respectively. While, combined instillation of cytosine arabinoside, a time-dependent anticancer agent, and urokinase resulted in high recurrence rates, 24.0 and 33.5 per cent for the postoperative 3 and 6 months, respectively. These data would recommend the topical use of dose-dependent anticancer agents such as alkylating agent and antibiotic rather than time-dependent anticancer agents.

KK-47, KW-103 and KN-41 were used for studies on the cytocidal effect of 7 anticancer agents. The effect on *in vitro* cultured cells was determined by a colony-forming method. Based on 50 per cent and 90 per cent lethal dosages in 2-hr and 24-hr exposures, the most prominent cytocidal effect on the cells was obtained by carboquone, adriamycin and mitomycin C. A mild cell killing effect was obtained by cis-platinum, VP-16, bleomycin and thio-TEPA. There were slight differences of cell killing effect among the cell lines, and the survival curves characteristic in cell killing modality would provide a valuable reference for their clinical use. The *in vitro* cytotoxicity of anticancer drugs should be compared with their clinical benefits and the improvement of the test system including much more significant cell lines is necessary to establish its clinical usefulness.

Enhanced cell killing effect by t-AMCHA, a potent antiplasmin agent, and carboquone or bleomycin on KK-47, KW-103 and KN-41 cells was investigated using the colony-forming method. The effect was observed in the combinations of 50 per cent lethal dose of the agents and 150 to 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of t-AMCHA. Much more clearly enhanced cell killing effect was also obtained in combination with another most potent antiplasmin agent, DV-1006, and these anticancer agents. While, EACA,

a relatively weak antiplasmin agent compared with t-AMCHA or DV-1006, possessed less combination effect. It is certain that an enhanced inhibitory action for the cell growth is achieved by combination of anticancer drugs and induced antifibrinolysis. However, further *in vivo* studies of the combination are necessary to clarify the role of antifibrinolysis in the combination effect.

A future new promising plan for tissue culture studies with regard to the development of diagnosis and treatment of bladder cancer was discussed.

Key words: Tissue culture. Fibrinolysis. Cytotoxicity test. Anticancer agents. Antiplasmin agents

緒 言

泌尿器科領域における凝固・線溶の研究は歴史的にみて前立腺癌症例における出血傾向の発現と血漿フィブリノーゲン低下に関する Jürgens and Trautwein (1930)¹⁾の報告に始まると考えられる。以来泌尿器科領域では欧米、本邦においても精力的に前立腺癌を中心としたこの方面の研究がなされ、今日各科領域において重要な DIC の病態が次第に解明され、その対策は救急医療の上でも必須のものとなっている。一方癌の発育・進展と凝固・線溶の関連や、抗癌剤の効果増強法としての線溶促進や抗線溶剤の併用など、20年以前に考えられなかったほど、この方面の研究は多彩かつ臨床的比重を一層増しているといえよう。筆者らの線溶の研究も約20年前に始まり²⁾、前立腺・精囊疾患と線溶の臨床的意義³⁾、さらに膀胱腫瘍の化学療法への応用⁴⁾など今日に至る研究の軌跡は、第18回、および第23回中部連合地方会においてそれぞれ中間的に特別講演として総括発表した。いうまでもなく凝固・線溶の研究はおもに血液凝固学の領域において大きな成長を遂げてきたが、泌尿器科疾患においても全身のみならず局所の組織内線溶異常の是正が臨床的に重要な場合のあることを主張してきた。今回は線溶研究の場に組織培養を新しく導入し、主として膀胱癌につき研究を行なったので、その基礎的研究とそれに基づいた臨床研究成績についても述べる。

膀胱癌と線溶の関連

癌と線溶の初期における互の関連はまず前立腺癌における線溶性出血で、この発見は癌と線溶の関連性を示唆した点で重要視され、今日筆者が線溶の研究に足をふみ入れる端緒となったものである。そのほか Table 1 に示すごとく発見、報告はいずれも今日盛んに行なわれている癌の発育・転移の研究において、基礎的知識となっていることはいうまでもない。いずれもこれらの報告は癌組織周辺における fibrin の沈着、除去が速やかに進行し、その過程に plasmin 系が積極

Table 1. 初期における癌と線溶のかかわり

Tagnon (1952).....	前立腺癌の線溶性出血の発見
Clifton & Grossi (1956)	あるヒト癌組織片のフィブリン溶解の発見
O'Meara (1958).....	癌細胞の cancer coagulative factor と癌組織フィブリン沈着
Grossi et al. (1960).....	実験腫瘍の転移をプラスミンが抑制
Pressman (1960) } Hiramoto (1960) }	癌組織周辺のフィブリン沈着の証明
Mutschler & Bale (1962)	担癌動物のフィブリノーゲン半減期が短縮する

Table 2. 癌の発育転移と凝固線溶

1. 癌細胞の生物学的性状のひとつとしての凝固、線溶ならびに線溶阻止因子活性
2. 癌の発育と凝固、線溶
3. 転移形成と凝固、線溶
4. 担癌生体の病態ないし副現象としての凝固、線溶異常
5. 癌化学療法と凝固、線溶
 - a. Plasmin, 線溶亢進剤の lysosome labilizer としての意義とその応用
 - b. 線溶阻止剤との併用効果

的に関与していることを示唆するものである。この方面の研究は今日シンポジウム⁵⁾の対象となるほど注目を集めているが、癌と凝固・線溶の病態生理学的意義づけにはなお多くの意見の不一致や、疑問の多いところである。それらの問題点を整理すると Table 2 のごとくである。すなわち基礎的には癌細胞の生物学的性状のひとつとしての凝固・線溶、ならびに阻止因子の産生はどうなっているのか、そしてそれらは癌の発育、転移形成の場で実際にはどのように作働しているのか、そのほか担癌生体における副現象としての DIC、線溶異常との関連、さらには癌化学療法における効果増強法としての線溶亢進剤、あるいは線溶阻止

剤の併用効果の機序などである。

一般に担癌生体は過凝固、低線溶状態に保たれていて、血栓の好発しやすい病態として知られている。たとえば膀胱癌患者を early stage と advanced stage に分類して各種の血清蛋白を micro-single radial immunodiffusion method により定量すると⁷⁾, Table 3 のごとく, protease inhibitors については α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, CIs-inhibitor などが増加し, advanced group にそれらは顕著で、一方 plasmin の precursor である plasminogen の減少が認められ、血液は低線溶に維持されていることが示される。antiplasmin のうち immediate inhibitor で抗トロンビン作用をも有する α_2 -macroglobulin は DIC では著しく低下し, slow inhibitor である α_1 -antitrypsin は正常の増加することが知られているが, advanced stage の症例では Table 3 のごとく, α_2 -macroglobulin の低下を示し, これらの症例では subclinical DIC に傾斜していることが推定される。一方膀胱癌組織においては、その抽出液を Sephadex にて分子篩にかけると、まず分子量の大きい plasminogen activator 活性を示す fraction が出現し、さらに urokinase や

Table 3. 膀胱腫瘍症例における血清蛋白異常

Early Stage (11 cases)		Advanced Stage (17 cases)	
α_1 antitrypsin	↑	α_1 antitrypsin	↑↑
α_1 antichymotrypsin	↑↑	α_1 antichymotrypsin	↑↑
α_2 macroglobulin	→	α_2 macroglobulin	↓
plasminogen	→	plasminogen	↓
cls-inhibitor	→	cls-inhibitor	↑↑
antithrombin III	→	antithrombin III	→

↑: $p < 0.05$ ↑↑: $p < 0.01$
(micro-single radial immunodiffusion method)

tissue activator に対し強い阻止効果を示す inhibitor の大きい fraction が出現し、全体的に膀胱癌組織は inhibitor 優位に保たれていることが示される⁸⁾. Fig. 1 は膀胱癌組織における fibrin 沈着を蛍光抗体法により示したもので、癌組織の低線溶状態は癌細胞の有する凝固因子とともに fibrin 沈着に有利な環境を形成していると考えられる。このような問題を研究の対象とする場合、基礎的研究として癌細胞の生物学的性状としての線溶につき検討しなければならない。その1つの手段として筆者は組織培養の研究に着手した。

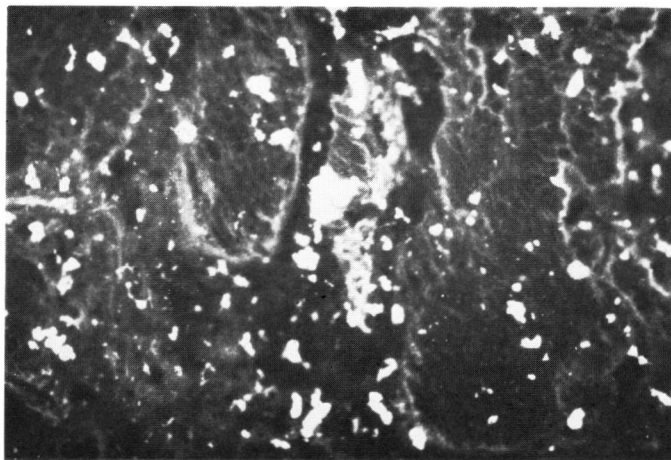


Fig. 1. Microscopic section of bladder cancer demonstrates multiple micro-fibrin depositions. Immunofluorescence method, reduced from $\times 100$.

当教室における組織培養の現況^{9~11)}

近年ヒト癌細胞を試験管内にて増殖させ、これを癌研究に応用する試みは泌尿器科領域においても急速に広がっている。1980年 Williams¹²⁾ のまとめた外国の報告では、ヒト泌尿器癌由来樹立細胞株は副腎皮質腫瘍の3株を含め、尿路上皮腫瘍29、辜丸腫瘍4、前

立腺腫瘍4、腎腫瘍16の合計56株の多数にのぼり、本邦でも筆者の集計したところでは Table 4 のごとく、当教室の4株を含め、腎癌9、膀胱癌4、辜丸腫瘍2、合計15株でこの方面の研究の盛んことが推定される。1975年当教室では泌尿器悪性腫瘍の組織培養に着手し、Table 5 のごとく172の腫瘍につき静置培養を施行し、初代培養が可能であったもの57腫瘍、

Table 4. 日本で樹立維持されているヒト泌尿生殖器癌細胞培養株

由来腫瘍	細胞株名	由来組織診断	樹立者	培養液	増殖形態	特徴
腎癌	NRC	腎細胞癌	小松原秀一	80%RPMI 1640+20%FCS	付着	
	KP-2	腎細胞癌	田中健蔵	90%MEM+10%FCS	付着	
	KU-2	腎細胞癌	田崎 寛 勝岡洋治	90%MEM+10%FCS	付着	Erythropoietin 産生
	GEP-1	腎細胞癌	田島知行	90%MEM+10%FCS	付着	Erythropoietin, Albumin, α_1 -antitrypsin, Transferrin産生
	OUR-10	腎細胞癌	松田稔ら	80%RPMI 1640+20%FCS	付着	
	KH-39	腎細胞癌	金沢大	80%HamF12+20%CS	付着	
	KN-41	腎細胞癌	金沢大	80%HamF12+20%CS	付着	
	KP-1	腎盂未分化癌	田中健蔵	90%MEM+10%FCS	付着	
	W-2	Wilms 腫瘍	長田 功	80%RPMI 1640+20%FCS	付着	
	KU-1	移行上皮癌	矢島暎夫	80%RPMI 1640+20%FCS	付着	
膀胱癌	KK-47	移行上皮癌	金沢大	80%HamF12+20%CS	付着	
	NBT-2	移行上皮癌	山本尊彦	80%MEM+20%FCS	付着	
	KW-103	移行上皮癌	金沢大	80%HamF12+20%CS	付着	
	ITO-I	睾丸胎児性癌	関口守正	80%DM160+20%FCS	付着	α -FP,HCG産生
辜丸腫瘍	ITO-II	辜丸胎児性癌	関口守正	80%DM160+ヒト臍帯血清	付着	α -FP,HCG産生

Table 5. 当教室の培養成績

Site of primary tumor	No. of specimens studied	Initial cell growth after inoculation	Growth of cells in vitro 1-12 mos.	Establishment of long-term cell lines in cultures longer than 12 mos.	Remarks
Kidney	46	23	20	2	KH-39 KN-41
Renal pelvis	12	5	4	0	
Ureter	9	4	0	0	
Bladder	104	24	12	2	KK-47 KW-103
Prostate	1	1	1	0	
Totals	172	57 (33.1%)	37 (21.5%)	4 (2.3%)	

33.1%で、なお1～12カ月にわたり細胞の増殖、発育の得られたもの37腫瘍、21.5%、このなかから株化されたものは腎癌2、膀胱癌2の4株である。特に尿路上皮性腫瘍では125の腫瘍中わずかに2株で、その技術の困難性が窺われる。その原因の1つとして尿路上皮性腫瘍では感染症の合併率が高く、細菌感染に対する抵抗性が低いことや、長期にわたる化学療法の既往を有するものが多い、また内視鏡検査など細菌感染の機会が多いことなどが考えられる。Fig. 2～5はそれぞれ当教室で樹立されたヒト腎癌由来の KH-39, KN-41, ヒト膀胱癌由来の KK-47, KW-103 である。当教室ではこのほか Dr. Collins の好意により送られてきたヒト膀胱癌由来の T24, RT4, J82 HCV-29 を保有し、そ

れぞれ研究に用いている。HCV-29はヒト非悪性膀胱上皮細胞由来の細胞株で種々の研究において対照として用いられる可能性を有する点で貴重なものと考えられる。

ヒト腎癌および膀胱癌由来培養細胞と線溶

筆者らは初代ないし2、3代培養細胞につき plasminogen activator の産生を検討した¹³⁾。用いた測定法は fibrin plate method で、正常腎皮質、腎髄質の培養液を用いるといずれも中等度の plasminogen activator 産生が認められ、これらは antiurokinase 家兔血清を用いて免疫学的に検討するといずれも urokinase type の activator であった。plasmin 活性は6例にきわめ

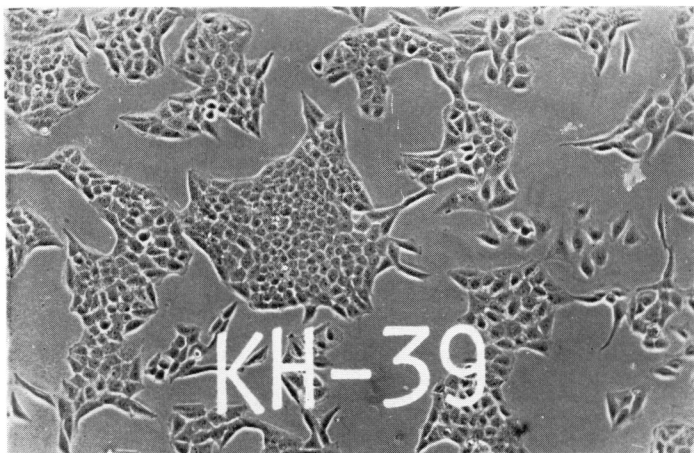


Fig. 2. Inverted microscopic photograph showing growing cells of KH-39 after 4 days in culture. Reduced from $\times 200$.

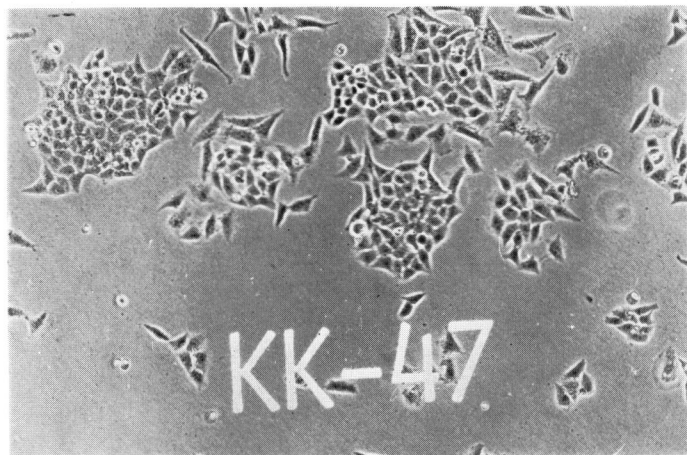


Fig. 4. Inverted microscopic photograph showing growing cells of KK-47 after 3 days in culture. Reduced from $\times 200$.

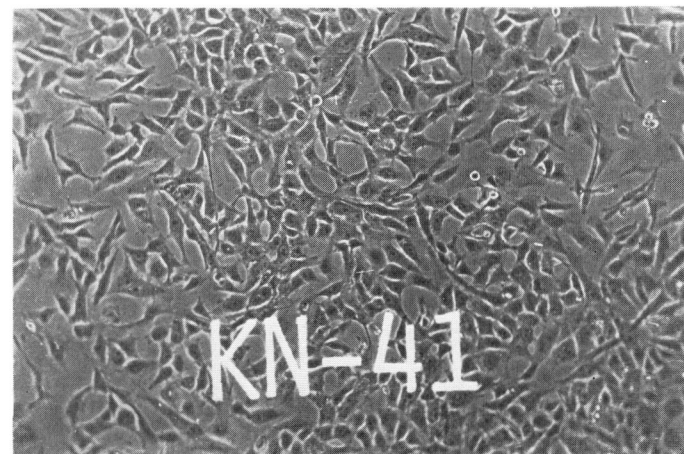


Fig. 3. Inverted microscopic photograph showing growing cells of KN-41 after 5 days in culture. Reduced from $\times 200$.

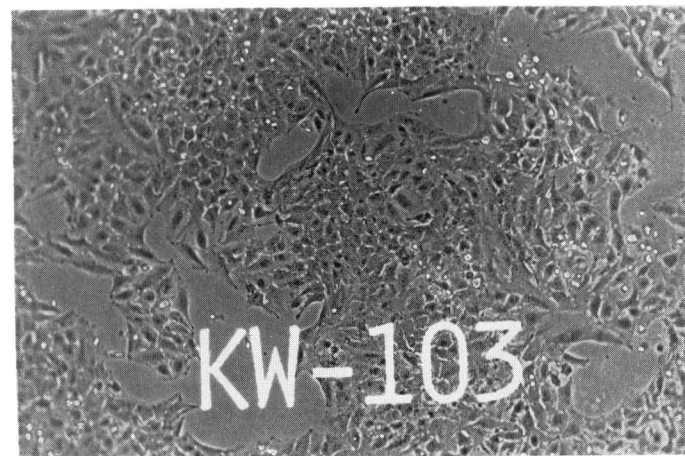


Fig. 5. Inverted microscopic photograph showing growing cells of KW-103 after 5 days in culture. Reduced from $\times 200$.

Table 6. 培養液上清中の線溶活性 (腫瘍組織由来)

	Plasminogen activator (CTA units/ml)	Plasminogen activator (CTA units/ml/ 1.0×10^4 cells)	Plasmin (c.u./ml)	($\times 10^4$ /ml)	
DK 2-K 3	0	0	0	3.4	EF-20
DK 3-K 2	0	0	0	1.4	EF-20
DK 5-K 6	0	0	0	1.8	EF-20
DK 8-K 9	0	0	0	6.9	EF-20
DK 10-K 11	0	0	0	1.6	EF-20
DK 17-K 36	0	0	0	8.3	EF-20
KK 2-K 4	0	0	0	9.0	EF-20
KK 6-K 15	0	0	0	1.2	EF-20
KK 9-K 18	0	0	0	17.8	EF-20
KK 11-K 20	0	0	0	11.0	EF-20
KK 21-K 28	0	0	0	5.1	FC-20
KB 2-B 1	0	0	0	76.7	FC-20
KB 23-B 5	0	0	0	21.1	EF-20
KB 25-B 7	0	0	0	5.0	EF-20
HeLa	0	0	0	42.2	FC-20

Table 7. 培養液上清中の urokinase inhibitory activity

Tissue: No.	Urokinase inhibitory activity	
	CTA units/ml	CTA units/ml/ 1.0×10^4 cells
Renal cell carcinoma		
DK3-K2	37.0	26.43
DK5-K6	8.0	4.44
DK8-K9	36.5	5.29
DK10-K11	18.0	11.25
KK2-K4	21.5	2.39
KK9-K18	21.5	1.21
KK11-K20	47.0	4.27
Bladder cancer (transitional cell carcinoma)		
KB2-B1	26.5	0.35
KB23-B5	18.5	0.88
KB25-B7	0	0
HeLa cells	5.0	0.12

Table 8. 培養期間と培養細胞数

Cell line	Cultivation period under serum-free condition			
	12 hrs	24 hrs	48 hrs	Note
T24	480.150	720.225	1,440.450	some dead cells
RT4	56.033	84.050	168.100	"
MANO	217.283	325.925	651.850	"
HCV	10.466	15.700	31.400	"
460HL	69.637	104.456	208.912	no dead cells

て軽度に認められたのみであった。これに対し腎癌、膀胱癌については Table 6, 7 に示すごとくいずれも plasminogen activator 活性は検出されず, urokinase に対する抑制効果をみると, 腎癌の場合軽度～中等度の inhibitory activity が認められ, 膀胱癌では軽度の inhibitory activity が証明された。これらの初代～2, 3 代の培養細胞には癌細胞以外に種々の細胞が混在するので, 株化細胞についても検討した。用いる培養液中に混在する線溶系物質は測定成績を不明確にす

るので, 血清を含まない Parker 199 medium を用いて再検討した。対象とした培養細胞株はヒト膀胱癌由来の T24, RT4, MANO, ヒト非悪性膀胱上皮細胞由来の HCV-29, ヒト肺 fibroblast 460 HI などである¹³⁾。Table 8 に示すごとく 48 時間培養において RT4, MANO などはゆっくりと細胞増殖を示すが, HCV-29 では増殖はきわめて不良であった。これらの細胞の培養液を 12 時間ごとに採取し fibrin plate method により検討すると RT4 のみに 24 時間後で 8.56×10^{-5} Ploug units/cell/12 hrs, 36 時間後に 12.61×10^{-5} Ploug units/cell/12 hrs の plasminogen activator の産生が認められた。この実験系には測定法, 培養液, 培養条件など多くの因子が plasminogen activator の検定に関与している可能性が推定された。一方 urokinase inhibitor の産生については, Table 9 に示すごとくその産生量や, 産生のタイミングに差は認められるが, いずれの細胞株においても inhibitor の産生が一定して認められたことは重要な所見と考え

Table 9. 培養液上清中 urokinase inhibitory activity

(the fibrin plate method)			
Sampling time	12 hrs	24hrs	36 hrs
Cell line			
T24	75	33	(-17)
RT4	1071	0	737
MANO	276	25	0
HCV-29	300000	(-42802)	22929
46OHL	5514	(-382)	1110

$\times 10^{-7}$ Ploug units/cell/12hrs
() lost amount

られる。ただこれらの実験では serum-free という細胞増殖には不適当な条件が用いられ、また fibrin plate method は比較的感度の低い測定法であるため、癌の増殖、発育の面では再検討の必要性が認められた。細胞発育の良好な 20% calf serum 含有の HamF 12 培地を用い、一方感度の高い ^{125}I release assay にて検討した。 ^{125}I -fibrin を coating した Falcon culture dish に KK-47, KW-103 の培養を行ない、培養液中に産生された plasminogen activator が fibrin を分解し、release された ^{125}I の cpm を測定し比較検討した。Fig. 6 に KW-103 の成績を示した。細胞増殖曲線は細胞植え込み後 3 日でプラトーに達し、以後減少する。培養液中に release された ^{125}I の cpm はほぼ細胞増殖曲線に平行して増強し、培養液中に蓄積されることが認められた。同時に培養皿の細胞をトリプシン処理にて集め、再三洗浄後遠心して得られた細胞の pellets についてもほぼ同様の radioactivity の上

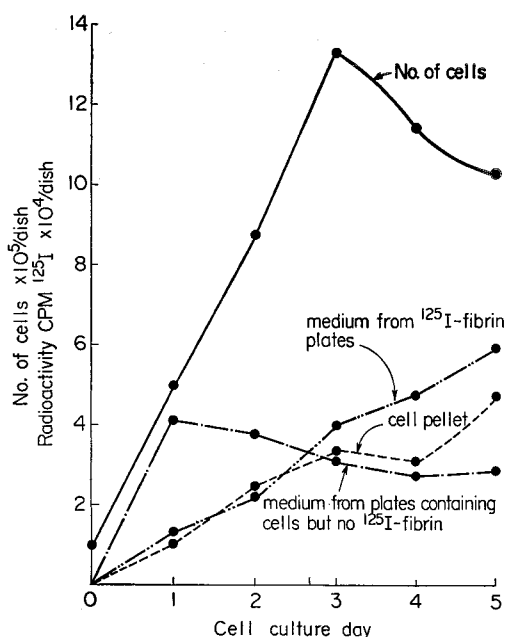


Fig. 6. Plasminogen activator activity of KW-103 cells.

昇が認められ、fibrin 分解産物が細胞膜に付着している可能性が推定された。なお fibrin 分解産物が癌細胞内に摂取されているかもしれないという推論もあり、これまでの fibrin が癌細胞の栄養源になっているとの考え方には興味ある成績と考えられた。さらに fibrin を coating していない Falcon culture dish に同じ条件で細胞を培養し、採取した培養液の cpm を

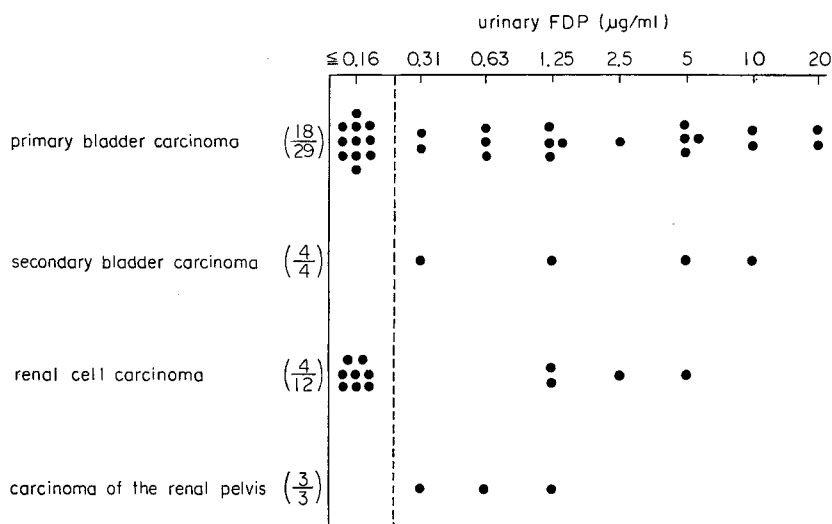


Fig. 7. 泌尿器悪性腫瘍と尿中 FDP

経日的に測定すると、plasminogen activator は培養1日後に cpm の上昇をもって産生が示されたが、それ以後細胞増殖曲線とは逆に産生の低下、あるいは停止が示唆された。場合によっては inhibitor の産生が activator のそれを越えたためかもしれない。同じ成績は KK-47 あるいは KN-41 においても観察され、癌細胞の発育と局所線溶の立場から考察すると、癌細胞は fibrin と共存するかしないかで、plasminogen activator 産生の態度に著しい差があると考えられる。すなわち fibrin の共存は癌細胞の plasminogen activator 産生を持続的に刺激、促進するもので、その結果 fibrin 除去、分解の過程が積極的に進行することを示唆するものと考えられる。

この *in vitro* の成績は *in vivo* の現象を説明する上で有意義なものであろう。この現象の末端は膀胱癌では尿中に FDP を遊離することで示されよう。現在この尿中 FDP は泌尿器悪性腫瘍の存在により比較的鋭敏に増加し、biochemical markers の1つと考えられている。Fig. 7 は筆者ら¹⁴⁾の成績の一部にすぎないが、膀胱癌では29例中18例、62%に高値を示し、それらは stage の進行とともに陽性率が高く、癌の発育、浸潤とともに fibrin 沈着が増強し、同時に局所線溶も亢進することを意味するものと考えられる。癌病巣内や周辺における fibrin 沈着は間葉系賦活作用を介して生体の癌発育に対する防禦反応の1つであるとの見解がある。それによれば癌発育と局所線溶の関係は生体と癌との戦いを意味し、FDP や血中 fibrinogen 値の亢進は病態の重症度を示すものといえよう¹⁵⁾。

癌化学療法と線溶

癌化学療法における線溶の研究は本邦においていち早く発展、定着した。それは plasmin urokinase などの lysosome labilizer としての意義、抗癌剤の癌組織内濃度上昇の意義が中心となっている。そのほか線溶抑制剤と抗癌剤の併用が癌の発育抑制効果を高め、かつ自然発生転移も抑制される可能性が論ぜられている。

KK-47 を用い *in vitro* における urokinase と thio-TEPA 併用による殺細胞効果を検討した¹⁶⁾。thio-TEPA は2時間薬剤接触にて50%細胞増殖抑制量 ID 50 に相当する 10 μ g/ml を、urokinase は細胞増殖に影響を与えない 10 CTA U/ml を用いた。Table 10 のごとく exposure time 24時間において、両者の併用効果が著明に認められ、また ³H-TdR uptake に対する効果も2時間 exposure において有意の低下がこの併用群に認められた。

つぎに ³²P-thio-TEPA を用いて、urokinase 併用時の細胞の uptake をみると、Table 11 のごとく30分作用後より uptake は急速に上昇し、2時間後に有意の peak に達した。6時間以上の作用では、併用効果が低下しているが、それは thio-TEPA が分解しやすく、不安定なためと考えられた。このような *in vitro* の成績を中心に、筆者ら^{4,17,18)}は膀胱癌再発防止法として膀胱内注入療法を採用してきた。thio-TEPA は1回 40 mg, carboquone は1回 4 mg, cytosine arabinoside は1回 200 mg を urokinase と併用し、術後週1回注入を5～6回、以後月1回注入を1年にわたり実施した。

これらの方法による腫瘍再発率を actuarial method により算出し一括表示すると Fig. 8 のごとくである。thio-TEPA, carboquone は治療後12カ月で、10および、14%、24カ月で22および33%の再発率で両群に有意差は認められなかった。thio-TEPA 併用注入群で

Table 10. Thio-TEPA, urokinase の作用時間と細胞増殖抑制

	Number of cells ($\times 10^4$ cells/ml)		
	Exposure time		
	2 hrs	24 hrs	72 hrs
Control	21.9 \pm 1.0	21.9 \pm 1.0	22.0 \pm 1.2
Urokinase (10 CTA U/ml)	22.7 \pm 1.7	22.6 \pm 0.9	21.7 \pm 1.0
Thio-TEPA (10 μ g/ml)	9.9 \pm 1.1	7.6 \pm 0.6	6.5 \pm 0.7
Thio-TEPA+urokinase	7.2 \pm 1.2	6.5 \pm 0.6	5.8 \pm 0.7

Table 11. Urokinase 併用による ³²P-thio-TEPA (10 μ g/ml) の細胞内取り込みの変化

³² P-thio-TEPA (10 μ g/ml)	Radioactivity (cmp)				
	1/2	1	2	3	6hrs
Urokinase					
1 CTA u/ml	46.8 \pm 5.0	73.3 \pm 18.0	59.2 \pm 10.4	61.7 \pm 16.2	54.3 \pm 3.3
10	60.0 \pm 9.2	92.8 \pm 13.0	129.7 \pm 10.8	113.7 \pm 9.1	98.8 \pm 22.0
100	78.2 \pm 9.8	98.5 \pm 20.8	93.1 \pm 16.0	57.8 \pm 6.8	63.8 \pm 17.1

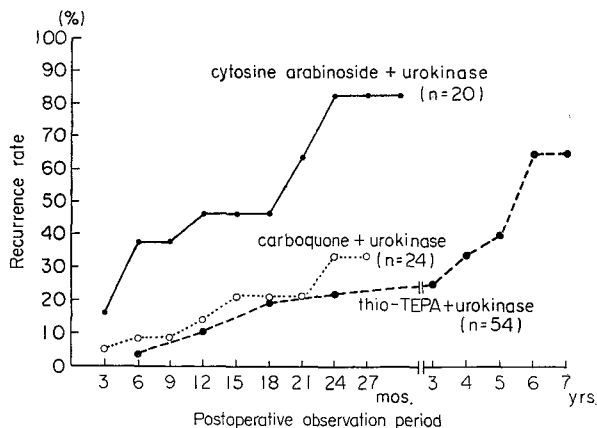


Fig. 8. 膀胱内注入療法における膀胱腫瘍再発率 (actuarial method)

は観察期間が7年の長期に及んでおり、注入療法終了後数年を経過してなお再発が認められ、注入療法の期間、抗癌剤の種類、その他検討すべき問題が多く、膀胱癌の発生病理と合せて今後の研究が必要である。一方 cytosine arabinoside の場合には有意に高い再発率が認められ、殺細胞様式上時間依存性の薬剤は注入療法上望ましくなく、濃度依存性薬剤が用いられるべきと考えられる。

培養細胞を用いた抗癌剤感受性テスト

起炎菌の薬剤感受性試験によって最適薬剤を選択使用する指導原理が確立されて以来、細菌感染症に対する化学療法の成果には目覚ましいものがある。ヒト癌の化学療法にも同様の考えにより癌細胞に最も有効な抗癌剤を選択使用できれば理想的と考えられる。筆者¹⁰⁾は個々の癌細胞の増殖能を直接検定しうるコロニ

一形成法を用い、培養癌細胞の薬剤感受性を定量的に検討した。本法には細胞単離率がよいこと、コロニー形成率が高いことなど用いる細胞にある程度制限がある。筆者は Falcone culture dish 3002 に200~300個の single cells を植え込み、24時間後各濃度の薬剤を2時間または24時間作用させ、洗浄後2週間培養をつづけ、生き残りコロニーを形成した細胞数を肉眼的に計算し、対照と比較して生残率を求めた。ここに1例として KW-103 を用いた adriamycin の感受性テストの結果を示すと、2時間作用の場合、Fig. 9 のごとく生残率曲線は濃度の増加とともに直線的に下降せず、横に移動する傾向が認められる。一方24時間作用の場合には Fig. 10 のごとく、薬剤濃度の増加とともに殺細胞効果は指数函数的に現れ、曲線は急峻な直線

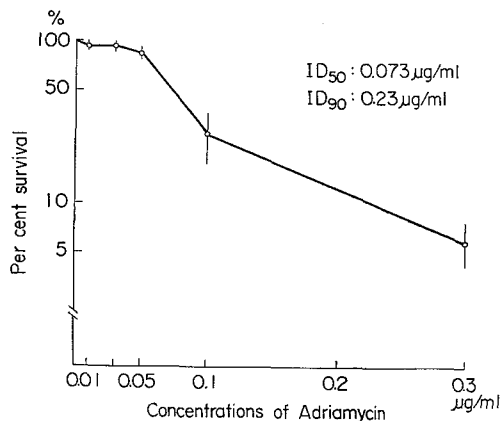


Fig. 9. Survival curve of KW-103 cells exposed to adriamycin for 2 hrs.

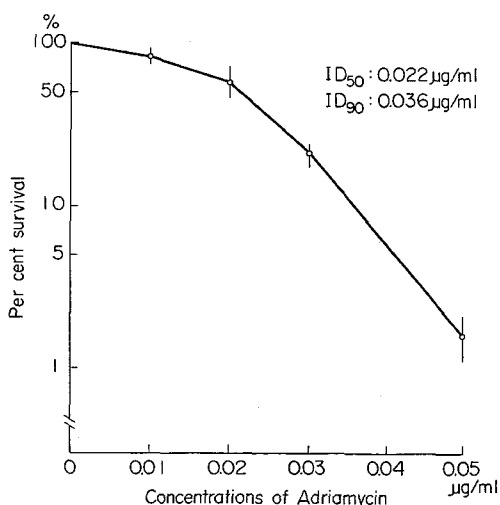


Fig. 10. Survival curve of KW-103 cells exposed to adriamycin for 24 hrs.

を示す。すなわち adriamycin には濃度依存性薬剤の特長とともに一部時間依存性殺細胞様式ももった薬剤と考えられる。このような殺細胞様式は bleomycin の場合一層明瞭で、薬剤高濃度部で細胞生残率が高く、比較的低感受性部分を有する特徴ある生残率曲線が得られる。癌細胞に対し抗腫瘍効果を発揮させるためには、このような殺細胞様式を明らかにし、至適投与法の設定が重要で、この種の研究の必要性が強調される。Table 12, 13 は KK-47, KW-103 の各種抗癌剤に対する感受性を ID 50, ID 90 から一括表示したものである。両細胞株間で ID 50 の間には大差を認めないが、ID 90 では KK-47 が一般に高値を示し、同じ組織型からの細胞株でも感受性に差のあることが認められた。これら抗癌剤のうち carboquone, adriamycin などに特にすぐれた殺細胞効果が認められた。しかしこのような感受性テストには用いられた薬剤の安定性、培養液の pH, 用いられた血清の種類や lot No., 細胞の doubling time など検討すべき問題点が多数あるが、今後多数の細胞株を用いたテストの結果と臨床成績との対比からその実用性を高める努力が必要と考えられる。

Table 12. KK-47 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果

exposure time	ID ₅₀ (μ g/ml)		ID ₉₀ (μ g/ml)	
	2hr	24hr	2hr	24hr
Thio-TEPA	7.6	1.0	193	3.0
Bleomycin	2.4	2.9×10^{-1}	20.1	1.5
NK-631	2.0	2.0×10^{-1}	11.6	1.9
VP-16	1.7	1.7×10^{-1}	3.8	4.8×10^{-1}
cis-Platinum	1.5	2.9×10^{-1}	3.4	6.7×10^{-1}
Mitomycin C	4.6×10^{-1}	2.3×10^{-1}	19.2	5.1
Adriamycin	3.1×10^2	1.0×10^{-2}	7.6×10^{-1}	7.5×10^{-2}
Carboquone	3.5×10^{-3}	1.1×10^{-3}	7.1×10^{-2}	1.0×10^{-2}

Table 13. KW-103 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果

exposure time	ID ₅₀ (μ g/ml)		ID ₉₀ (μ g/ml)	
	2hr	24hr	2hr	24hr
Thio-TEPA	11.0	1.1	26.0	1.8
VP-16	2.3	2.4×10^{-1}	7.5	4.7×10^{-1}
Bleomycin	1.7	1.5×10^{-1}	6.4	4.1×10^{-1}
cis-Platinum	1.6	2.2×10^{-1}	3.9	4.9×10^{-1}
Mitomycin C	2.2×10^{-1}	2.4×10^{-2}	4.4×10^{-1}	4.4×10^{-2}
Adriamycin	7.3×10^{-2}	2.2×10^{-2}	2.3×10^{-1}	3.6×10^{-2}
Carboquone	8.4×10^{-3}	1.0×10^{-3}	2.1×10^{-2}	1.9×10^{-3}

抗 plasmin 剤と抗癌剤の併用効果

近年一部で各種の動物実験腫瘍や臨床例において、抗 plasmin 剤である t-AMCHA が抗癌剤の効果を高

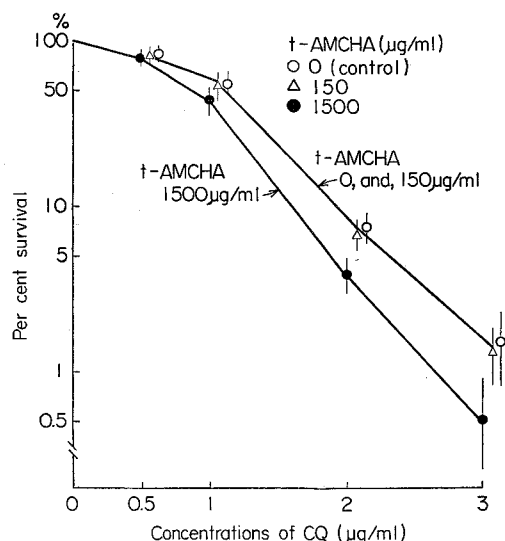


Fig. 11. Survival curves of KK-47 cells exposed to different concentrations of carbazil-quinone and t-AMCHA.

めるとの報告が散見される^{20,21)}。しかしそれらに対する理論的裏付けはきわめて不十分である。筆者は組織培養により *in vivo* における t-AMCHA 併用による bleomycin, carboquone の殺細胞効果増強を検討した。KK-47 を用い、24 時間薬剤作用時では t-AMCHA 単独では細胞増殖抑制効果を全く示さないが、Fig. 11 のごとく、carboquone, との併用において t-AMCHA は 1500 μ g/ml の濃度により細胞生残率曲線に有意の低下が認められた。これを ID 50 から検討すると Table 14 のごとくまとめることができる。carboquone 0.5~ 3×10^{-3} μ g/ml の各濃度において t-AMCHA 150 μ g/ml~1500 μ g/ml の併用にて有意の増強効果が示された。bleomycin においても 0.3~3.0 μ g/ml の濃度において、t-AMCHA 1500 μ g/ml の併用により殺細胞効果の有意の増強が認められた。KN-41 を用いた場合にもほぼ同様の併用効果が認められた。t-AMCHA より弱い抗 plasmin 作用の EACA では併用効果はほとんど認められず、さらに強力な抗 plasmin 作用を有する DV 1006 では著明な増強効果が認められたことから抗 plasmin 剤乃至抗 plasmin 作用の併用効果は明らかであるが、今後 *in vivo* における効果の検討など、抗 plasmin 剤の生体を介した作用も充分考慮されねばならない。詳細な作用機序の解明は今後の興味ある課題といえよう。

筆者ら²²⁾はこのほか、放射線、温熱、抗癌剤などの併用効果についても基礎的研究を行ってきたが、基本的には癌細胞の有する種々の生物学的活性をさらに

Table 14. KK-47 細胞における carbazilquinone の殺細胞効果に対する t-AMCHA の増強効果

t-AMCHA $\mu\text{g/ml}$	CQ	ID ₅₀ $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$
0		1.04
150		1.00
1500		0.879

Fisher's LSD	
t-AMCHA	CQ
0	0.5 1 2 3
150	0.5 1 2 3
1500 $\mu\text{g/ml}$	0.5 1 2 3

$\times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$

* $p < 0.05$ ** < 0.01

検討すべきと考えている。その点からもこれら培養細胞の産生する biochemical markers をチェックすべきで、筆者らは *in vitro* にてこれら培養細胞から AT III, Cp, ClsI, $\alpha_2\text{M}$, Alb, Hx, C3, β_2 -microglobulin, α -fetoprotein, β -HCG, CEA などの産生が予想されるデータを得つつあり、今後の研究に応用すべきと考えている。

以上筆者の最近の組織培養を中心とした研究成績の一部を述べ、今後の問題点や展望についてもふれた。

終りにこの研究にたえざる御指導を頂いた黒田恭一教授をはじめ、御協力を惜しまなかった教室員、関連病院各位に深謝します。

文 献

- 1) Jürgens, R. and Trautwein, H.: Über Fibrinopenie (Fibrinogenopenie) beim Erwachsenen, nebst Bermerkungen uber die Herkunft des Fibrinogens. Deutsch. Arch. Klin. Med., **169**: 28~43, 1930.
- 2) 黒田恭一・久住治男・向來義彦: 前立腺疾患に対する経尿道的切除術と Fibrinolysis について. 手術, **14**: 921~927, 1960.
- 3) 黒田恭一・久住治男: 泌尿器科領域における線溶系. 最新医学, **21**: 296~306, 1966.
- 4) Hisazumi, H., Uchibayashi, T., Naito, K., Misaki, T. and Miyazaki, K.: The prophylactic use of thio-TEPA and urokinase in transitional cell carcinoma of the bladder: a preliminary report. J. Urol., **114**: 394~398, 1975.
- 5) Tagnon, H.J., Whitmore, W.F., Jr., Schulman, P. and Kravitz, S.C.: Significance of fibrinolysis occurring in patients with metastatic cancer of the prostate. Cancer, **6**: 63~67, 1953.
- 6) 癌をめぐる線溶系とその周辺. 第19回プラスミン研究会報告集, 札幌, 第一製薬株式会社, 1979.
- 7) 久住治男・中嶋和喜・塚原健治・黒田恭一・右田俊介: 膀胱癌患者における血清蛋白の変動. 泌尿紀要, **26**: 265~271, 1980.
- 8) Hisazumi, H.: Studies on the fibrinolytic activity in cancerous tissues: a study by gel filtration. Acta Urol. Jap., **21**: 731~734, 1975.
- 9) 内藤克輔: 組織培養法による泌尿器悪性腫瘍の fibrinolysis の研究. 日泌尿会誌, **68**: 909~923, 1977.
- 10) 田谷 正・小林徹治・塚原健治・打林忠雄・内藤克輔・久住治男・黒田恭一: ヒト尿路悪性腫瘍の組織培養. 日泌尿会誌, **68**: 1003~1010, 1977.
- 11) 久住治男・鹿子木基二・中嶋和喜・小林徹治・塚原健治・内藤克輔・黒田恭一・松原藤雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 の生物学的特性について. 日泌尿会誌, **70**: 485~494, 1979.
- 12) Williams, R.D.: Human urologic cancer cell lines. Invest. Urol., **17**: 359~363, 1980.
- 13) Hisazumi, H., Andersson, L. and Collins, V.P.: Fibrinolytic activity of in vitro cultivated human bladder cell lines. Urol. Res., **5**: 133~139, 1977.
- 14) 大滝三千雄: 泌尿器悪性腫瘍における血清および尿 FDP の検討. 日泌尿会誌, **68**: 1172~1183,

- 1977.
- 15) 久住治男・打林忠雄・内藤克輔・三崎俊光：泌尿器悪性腫瘍患者における dysproteinemia と線溶について. 日泌尿会誌, 65: 488~499, 1974.
 - 16) 田谷 正：ヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47 細胞) における thio-TEPA の殺細胞作用に対する urokinase の併用効果. 日泌尿会誌, 70: 15~27, 1979.
 - 17) 久住治男・打林忠雄・内藤克輔・三崎俊光・宮崎公臣・黒田 恭一：膀胱癌再発防止法としての thio-TEPA と urokinase の併用膀胱内注入療法. 泌尿紀要, 21: 735~742, 1975.
 - 18) 久住治男・西東康夫・加藤正博・中嶋和喜・小林徹治・打林忠雄・田谷正・三崎俊光・宮崎公臣・黒田恭一：膀胱癌再発防止法としての抗癌剤と urokinase の併用膀胱内注入療法の長期観察. 癌と化学療法, 5: 835~842, 1978.
 - 19) 久住治男・打林忠雄・黒田恭一：ヒト膀胱癌由来 KK-47 培養細胞株を用いた抗癌剤感受性試験について, 第1報. 癌と化学療法, 6: 1057~1062, 1979.
 - 20) Åstedt, B., Gilfberg, I., Mattsson, W. and Trope, C.: Arrest of growth of ovarian tumor by tranexamic acid. J.A.M.A., 238: 154~155, 1977.
 - 21) Åstedt, B., Mattsson, W. and Trope, C.: Treatment of advanced breast cancer with chemotherapeutics and inhibition of coagulation and fibrinolysis. Acta Med. Scand., 201: 491~493, 1977.
 - 22) 中嶋和喜：ヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47 細胞) における温熱および放射線による殺細胞効果の研究. 日泌尿会誌, 71: 363~377, 1980.